

論文内容要旨

報告番号	甲 先 第 212 号	氏 名	田尻 健志
学位論文題目	微小球の光共振特性を用いた酵素の高感度・迅速検出に関する研究		
<p>内容要旨</p> <p>光共振器は小さな空間に長時間にわたり光を閉じ込めることができるため、光と物質との相互作用を増強することができる。このため、光共振器に標的物質と特異的に結合する抗体を組み合わせることで、小型かつ高感度のバイオセンサーになると考えられている。極微量の標的物質を高感度に検出できる既存のバイオセンサーは、血糖検査や食品検査などに利用されているが、培養法を併用しているため検査工程が複雑で時間を要す。また、培養法を用いない表面プラズモン共鳴 (SPR) を利用したバイオセンサーも実用化されつつあるが、感度、サイズ、検査チップと検査装置の価格に課題がある。</p> <p>そこで本研究では、微小球の光共振特性と抗原抗体の特異性を融合した安価な微小球プローブを作製し、従来技術では不可能であった培養前の微生物汚染を短時間に高感度に検出できる新規の検査手法を開発することを目的とする。標的とする微生物は食品検査の衛生指標菌である大腸菌群とし、大腸菌群が有する特異な分解酵素 (β-Galactosidase) を標的物質として評価し、以下の結果が明らかとなった。</p> <p>微小球プローブは、Mie 理論の散乱断面積により PS 微小球 (直径 10μm、屈折率 1.59、カルボキシル基修飾) を選定し、アミド結合により抗体 (anti-β-Galactosidase) が固定化された。抗体の固定化比率は吸光度測定 ($\lambda=280$nm) より 30~50%、単一の微小球表面に固定化された抗体量は 6.935pg~10.806pg と推定した。</p> <p>検査溶液中の微小球プローブはカバーガラスで封止し、油浸対物レンズ (100\times、NA 1.25) の全反射減衰配置によるエバネセント光で励起し、長距離作動対物レンズ (50\times、WD=13.8mm) で散乱光を検出した。励起光のスポット径は微小球径以下に集光し、単一の微小球のみにエバネセント光を作用させた。このため、標的の微小球以外から散乱する背景光を軽減し、微小球表面を周回するウィスパリングギャラリーモード (WGM) を経時的に高感度で観測できた。</p> <p>PS 微小球の表面状態の評価は、散乱光の共振ピーク波長のシフトを Mie 理論の散乱断面積により解析し、抗体 (anti-β-Galactosidase) と抗原:酵素 (β-Galactosidase) の厚みはそれぞれ 14nm と 16nm、屈折率は 1.50~1.56 と算出できた。これらの値は実験に用いた抗体と抗原の仕様と一致し、微小球表面の抗体と抗原は単一層を形成することがわかった。また、酵素濃度に対する抗原抗体反応時間依存性より、酵素吸着の判定時間は 8 分、酵素濃度の下方検出限界として 5μg/ml が得られた。さらに、偏光に対応する共振ピーク波長のスプリット変化が微小球を周回する WGM の軌道面と関係し、このスプリット変化を観測することで微小球の吸着物を容易に判定できる可能性を示した。</p> <p>以上の結果より、単一の微小球を全反射減衰配置で励起し、散乱光から得た共振ピーク波長の変化を観測することで、特異的な汚染物質を高感度かつ迅速に判定できるバイオセンサーとして利用できることが明らかになった。また、これらの評価手法は微小球の表面状態の特性評価 (サイズや屈折率など) に有用であることが証明された。</p>			

論文審査の結果の要旨

報告番号	甲 先 第 212 号	氏 名	田 尻 健 志
審査委員	主査 橋本 修一 副査 井須俊郎 副査 原口雅宣		
学位論文題目 微小球の光共振特性を用いた酵素の高感度・迅速検出に関する研究			
審査結果の要旨 本研究では、バイオセンシング機器の開発状況と食品業界の微生物検査の現状を踏まえ、光による高感度かつ簡便・迅速な酵素検査手法の開発を目的としており、第1章でその点が明確に述べられている。 第2章では、本研究で採用するバイオセンサー応用のための誘電体微小球共振器の光学特性と酵素の検出原理、抗原抗体反応による選択的な生体分子検出の為の技術についての概要を述べている。 第3章では、微小球を表面修飾技術によって抗原抗体反応を利用したバイオプローブとする作製方法と検査対象分子濃度と光学特性の関係を明らかにしている。 第4章では、微小球の光学モード特性計測のための顕微分光システム構築について述べ、同システムを用いた単一微小球の光散乱特性の計測や単一微小球からの蛍光の分光計測に成功している。 第5章では、微小球表面に酵素が選択的に吸着した際の散乱光特性評価により、酵素検出に成功しており、8分の測定時間で、5 $\mu\text{g/L}$ の下方検出限界にて、測定対象の酵素検出に成功している。 以上本研究は、誘電体微小球共振器の表面に選択的に付着した酵素によるモード変化を検出することによって、水中に分散された酵素の高感度かつ簡便・迅速な検出が可能であることを明らかにするもので、バイオセンシング機器開発や食品業界の微生物検技術に対する重要な結果を得ており、本論文は博士（工学）の学位授与に値するものと判定する。 なお、本論文の審査には、岡本敏弘准教授の協力を得た。			